

«ЧАСТО И ДЛИТЕЛЬНО БОЛЕЮЩИЙ РЕБЕНОК» И СПОРТ**Е.Г. Калаур¹, Ю.Н. Деркач¹, Т.Г.Вербицкая²**¹Полесский государственный университет, derkach_un@tut.by²Одесский государственный медицинский университет

В структуре первичной заболеваемости детей РБ первое место занимают болезни органов дыхания, при этом на долю часто и длительно болеющих детей (ЧБД) приходится более 30% случаев.

Частые острые респираторные заболевания у детей определяют высокий риск формирования хронической патологии. Вместе с тем, большинство детей, состоящих в группе часто и длительно болеющих, желают заниматься спортом. Многие исследователи вносят занятия физической культурой в комплексную программу оздоровления таких детей и приводят убедительные данные улучшения их физического состояния и здоровья. Однако, отбор детей группы ЧБД в профессиональный спорт требует дополнительных исследований, в том числе, полиморфизма генов ферментативных систем метаболизма, определяющих устойчивость организма к воздействию повреждающих факторов внешней среды и возможность заниматься спортом высоких достижений [1-7]. Одной из задач при осуществлении отбора таких детей в профессиональный спорт является определение возможного риска для их здоровья.

Целью настоящей работы явилось изучение особенностей распределения аллельных вариантов генов, кодирующих ферменты фазы 1 (CYP1A1, CYP1A2) и фазы 2 (NAT2, GSTM1, GSTT1) детоксикации ксенобиотиков у детей группы ЧБД и в контрольной группе детей.

В работе были проанализированы две группы жителей г. Пинска: 52 часто и длительно болеющих ребенка (30 девочек и 22 мальчика, средний возраст $3,17 \pm 1,78$) и 50 детей, соответствующих по возрасту и полу детям группы ЧБД.

Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) исследованы частоты полиморфных аллелей генов CYP1A1, CYP1A2, NAT2, GSTM1, GSTT1 у детей группы ЧБД и контрольной группы.

Для проведения молекулярно-генетического анализа отбирались образцы венозной крови в количестве 5 мл. Выделение ДНК проводилось стандартным методом из лимфоцитов с использованием гуанидина. Частоты различных генотипов генов были исследованы методом ПЦР. ДНК из крови выделяли методом фенол-хлороформной экстракции и растворяли в 10мМ Трис/1мМ ЭДТА, pH 8,0 и хранили при 4 °С. Для обнаружения генетического полиморфизма, использовали метод исследования полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) в комбинации с ПЦР. Смесь для амплификации объемом 15 мкл включала 0,2 мМ каждого праймера, 10мМ трис-HCl, pH 8.3, 1,25мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 200 мМ каждого дезоксирибонуклеотида и 0,5 ед. Taq-полимеразы и 1,5 мкл геномной ДНК. Реактивы для постановки ПЦР были синтезированы в "Си-лекс", Москва. Для статистической обработки результатов использовали стандартный метод Йетса с поправкой на непрерывность и двусторонний критерий Фишера.

Результаты анализа частот полиморфных аллелей, кодирующих ферменты 1 фазы детоксикации ксенобиотиков, представлены в табл. 1. Как следует из полученных данных, частоты аллелей и генотипов для генов CYP1A1, CYP1A2 достоверно не отличаются у детей группы ЧБД и в контрольной группе. Частоты мутантных аллелей для цитохромов CYP1A1, CYP1A2 не превысили 10%.

Таблица 1. Распределение генотипов и аллелей генов CYP1A1, CYP1A2 у детей группы ЧБД и в контрольной группе

Генотипы	Частота, %	
	Ч Б Д	контроль
CYP1A1		
N/N	93.1	89.2
N/F	6.9	10.8
N	96.5	95
F	3.5	5
CYP1A2		
N/N	82.8	94.5
N/M	14.9	5.5
M/M	2.4	0
N	90.2	95.2
M	9.8	4.8

Результаты анализа аллельных вариантов генов, кодирующих ферменты 2 фазы детоксикации, у детей группы ЧБД и в контрольной группе представлены в табл. 2. Частота гомозигот по нулевому аллелю гена GSTM1 в контрольной группе соответствовала таковой в популяции Северо-Западного региона России (42.2%) и составила 43.2%. У детей группы ЧБД частота гомозигот гена GSTM1 O/O (56.8%) несколько превысила популяционный уровень, однако при сравнении с контрольной группой достоверных различий выявлено не было.

Частота гомозигот по нулевому аллелю гена GSTT1 в контрольной группе оказалась несколько ниже популяционной (23.3%) и составила 15%. У детей группы ЧБД было выявлено достоверное повышение частоты гомозигот по нулевому аллелю гена GSTT1 (табл. 2). Так, частота GSTT1 O/O у детей группы ЧБД составила 36% и достоверно отличалась от таковой в контрольной группе ($\chi^2 = 5.82$; $p < 0.05$). Риск частых ОРЗ у детей, имеющих генотип GSTT1 O/O, увеличивается в 3.26 раза ($CI_{95\%} = 1.25-8.49$).

При сравнении распределения полиморфных аллелей гена NAT2 достоверных различий между исследованными группами выявлено не было (табл. 2). При этом "медленный" аллель S доминировал как в контрольной группе, так и у детей группы ЧБД (67.9 и 65.5% соответственно).

Таблица 2. Распределение генотипов и аллелей генов GSTM1, GSTT1, NAT2 у детей группы ЧБД и в контрольной группе

Генотипы	Частота, %	
	ЧБД	контроль
GSTM1		
+	43.2	56.4
O/O	56.8	43.6
GSTT1		
+	64	85
O/O	36	15
NAT2		
N/N	14.9	15.4
N/S	32.4	38.5
S/S	52.7	46.2
N	34.5	32.1
S	65.5	67.9

В таблице 3 показано распределение частоты встречаемости шести однонуклеотидных замен в позициях 282, 341, 481, 590, 803 гена NAT2 у детей группы ЧБД и контрольной группы детей. Это основные, наиболее часто встречающиеся замены в европейской выборке, вносящие вклад в изменение фенотипа ацетилирования. Частота встречаемости в большинстве из замен достоверно не различаются ($p > 0.01$) в контрольной выборке и у детей группы ЧБД, но в позициях 341, 590 определяется значительное преобладание частоты встречаемости однонуклеотидных замен в группе часто болеющих детей по отношению к контрольной группе детей ($p > 0.3$).

Таблица 3. Анализ частот встречаемости полиморфизмов гена NAT2 в позициях 282, 341, 481, 590, 803 у детей группы ЧБД и контрольной группы детей в г. Пинске

Гено-тип	Позиция 282		Позиция 341		Позиция 481		Позиция 590		Позиция 803	
	ЧБД	Контр.г гр.	ЧБД	Контр. гр.	ЧБД	Контр. гр.	ЧБД	Контр. гр.	ЧБД	Контр. гр.
AA	0,49	0,59	0,36	0,33	0,4	0,33	0,36	0,32	0,36	0,33
Aa	0,42	0,36	0,16	0,52	0,5	0,58	0,29	0,57	0,51	0,57
aa	0,09	0,05	0,48	0,15	0,1	0,09	0,35	0,11	0,13	0,10

Наиболее интересные результаты получены при суммарном анализе сочетаний генотипов по генам GSTM1, GSTT1, NAT2 (табл. 4).

Среди детей группы ЧБД индивидуумы с генотипом GSTM1 O/O, NAT2 S/S встречались почти в 3 раза чаще, чем в группе контроля (33.8% и 12.8% соответственно, $\chi^2 = 5.34$, $p < 0.05$). Риск частых ОРЗ у детей с таким генотипом возрастает в 3.5 раза ($CI_{95\%} = 1.26-9.59$).

Сходная ассоциация выявлена и в отношении комплекса нулевых аллелей генов GSTM1 и GSTT1 (табл. 4). Доля гомозигот по нулевым аллелям этих генов среди детей группы ЧБД оказалась в 4 раза больше в сравнении с контролем (21.6% и 5% соответственно, $\chi^2 = 5.93$, $p < 0.05$). Риск частых ОРЗ при таком сочетании генотипов увеличивается в 5.6 раза ($CI_{95\%} = 1.4-22.62$).

Анализ сочетания генов GSTT1, NAT2 выявил возрастание доли функционально неполноценных генотипов почти в 20 раз у детей группы ЧБД по сравнению с контролем (20.3 и 2.5% соответственно, $\chi^2 = 6.59$, $p < 0.05$). Риск частых ОРЗ у детей с генотипом GSTT1 O/O, NAT2 S/S повышен в 9.7 раза ($CI_{>5\%} = 1.71-54.60$) (табл. 4).

Таблица 4. Частоты функционально неполноценных генотипов (фазы 2 детоксикации) у детей группы ЧБД и в контрольной группе

Функционально неполноценный генотип	Частота генотипа, %		χ^2	Относительный риск
	ЧБД	контроль		
GSTM1 O/O, NAT2 S/S	33,8	12,8	5,34 $p < 0,05$	3,47 ($CI < 1,26-9,59$)
GSTM1 O/O, GSTT1 O/O	21,6	5	5,93 $p < 0,05$	5,63 ($CI < 1,4-22,62$)
GSTT1 O/O, NAT2 S/S	20,3	2,5	6,59 $p < 0,05$	9,77 ($CI < 1,71-54,60$)

Закключение:

1. У детей группы ЧБД было выявлено достоверное повышение частоты гомозигот по нулевому аллелю гена GSTT1.

2. Среди детей группы ЧБД индивидуумы с генотипом GSTM1 O/O, NAT2 S/S встречались почти в 3 раза чаще, чем в группе контроля (33.8 и 12.8% соответственно, $\chi^2 = 5.34$, $p < 0.05$). Риск частых ОРЗ у детей с таким генотипом возрастает в 3.5 раза.

3. Сходная ассоциация выявлена и в отношении комплекса нулевых аллелей генов GSTM1 и GSTT1. Доля гомозигот по нулевым аллелям этих генов среди детей группы ЧБД оказалась в 4 раза больше в сравнении с контролем (21.6% и 5% соответственно, $\chi^2 = 5.93$, $p < 0.05$). Риск частых ОРЗ при таком сочетании генотипов увеличивается в 5.6 раза ($CI_{>5\%} = 1.4-22.62$).

4. Риск частых ОРЗ у детей с генотипом GSTT1 O/O, NAT2 S/S повышен в 9.7 раза ($CI_{>5\%} = 1.71-54.60$). Детям с генотипом GSTT1 O/O, NAT2 S/S рекомендовать занятия профессиональным спортом не представляется возможным.

5. Частота встречаемости в позициях 282, 481, 803 гена NAT2 у детей группы ЧБД и контрольной группы детей достоверно не различаются ($p > 0.01$). Генетический полиморфизм гена NAT2 в позициях 341, 590 определяется как значительное преобладание частоты встречаемости однонуклеотидных замен в группе часто болеющих детей по отношению к контрольной группе детей ($p > 0.3$).

Литература

1. Баранов В.С., Баранова В.Е., Ивашенко Т.Э. и др. Геном человека и гены «предрасположенности». Введение в пре-диктивную медицину. Санкт-Петербург 20002. Григорьева С.А., Никитина В.А., Косякова Н.В., Кириллов А.В., Аксенова М.Г., Сидорова И.Е., Ревазова Ю.А., Чеботарев А.Н., Бочков Н.П. «Частота полиморфизмов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков CYP1A1, GSTM1 и GSTT1 у жителей города Москвы». Журнал "Медицинская генетика", 2007, № 3., с.38-43.
2. Попова, С.Н. Полиморфизм глутатион-S-трансфераз M1 и M2 в ряде популяций России / Попова С.Н, Сломинский П.А., Галушкин С.Н. // Генетика. – 2002. – Т. 38, №2. – С. 281-284.
3. Салимова, А.З. Изучение этнотерриториальных групп по
4. Christiansen, L. Association between CYP1A2 polymorphism and susceptibility to porphyria cutanea tarda /Christiansen L., By-gum A, Jensen A. // Hum Genet. – 2000.-Vol.107. – P. 612-614
5. Functional significance of a C>A polymorphism in intron 1 of the CYP1A2 gene tested with caffeine/Cristoph S., Jurgen Brockmoller, Steffen Bauer.Br//J.Clin.Pharmacol. – 1999. – Vol. 47. – P. 445 - 449.
6. Michiro, Ch. Detection of three genetic polymorphisms in the 5'-Flanking Region and intron 1 in human CYP1A2 in the Japa-nese population /Michiro Ch., Tsuyoshi Yokoi, Takafumi Fukui, //J. Cancer res. – 1999. – Vol. 90. – P. 899-902.